

Thrombose en thrombine

Citation for published version (APA):

Hemker, H. C. (1990). Thrombose en thrombine. *Verslag van de gewone vergaderingen der Afdeeling Natuurkunde*, 99(6), 61-71.

Document status and date:

Published: 01/01/1990

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Voordracht gehouden in de gewone vergadering van de Afdeling Natuurkunde der Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen op 18 juni 1990

THROMBOSE EN THROMBINE

H C Hemker

Een niet onbelangrijk aantal van de meest voorkomende ziekten wordt veroorzaakt door thrombose, d.w.z. door afsluiting van bloedvaten. Afsluiting van slagaderen ligt ten grondslag aan hartinfarct en beroerte. Veneuse thrombose ontstaat bij bedlegerige patienten, vooral postoperatief, en kan leiden tot dodelijke longembolie. Tesaamen zijn thrombotische ziekten in Nederland verantwoordelijk voor ~50% van alle sterfgevallen, kanker voor ~30% en de overige oorzaken, inclusief ongelukken voor 20%.

De oorzaak van thrombose is een thrombus, een bloedklont die in wezen identiek is aan de prop die de bloedende vaten in een wond afsluit. De bestudering van hemostase (= bloedstelping) en thrombose loopt dan ook volledig parallel. Bij beide processen speelt thrombine, het enzym dat bloed doet stollen, een centrale rol.

In 1894 werd door **Pekelharing**¹ (1848-1922) hier in deze Academie voor het eerst melding gemaakt van de isolering van een fractie uit bloedplasma die, als men hem met een weefselextract behandelt zelf niet zichtbaar verandert maar wel het vermogen verkrijgt om een andere fractie uit bloedplasma te doen stollen. Hij trok de juiste conclusie, nl. dat hij in de eerste fractie het proenzym van het stollingsenzym thrombine (het prothrombine dus) geïsoleerd had en in de tweede fractie het eigenlijke stollende eiwit (het fibrinogeen). Deze ontdekking wordt over het algemeen toegeschreven aan de duitser Alexander Schmidt (1831-1894)². Die had echter het prothrombine alleen maar op theoretische gronden gepostuleerd zonder het bestaan ervan

ook experimenteel aan te tonen. Gezien het belang van de ontdekking van Pikelharing, die bovendien voor zover ik weet de eerste isolering van een proenzym was, zou het misschien een idee zijn om hem in 1994 op gepaste wijze te herdenken.

Thrombine ontstaat in stollend bloed door de samenwerking van een vijftiental plasmaeiwitten. Het ontstaan van thrombose kan men bestrijden door de ontwikkeling van thrombine te remmen. Er zijn twee groepen van farmaca die dit effect hebben: **orale anticoagulantia** en **heparines**. De orale anticoagulantia (Marcoumar, Sintrom), zijn antagonisten van vitamine K. Zij remmen het voorlaatste stadium van de vorming van stollingsfactoren in de lever, waardoor er een afwijkende vorm van stollingsfactor (PIVKAs = proteins induced by vitamin K absence) in het bloedplasma terecht komt, waardoor er minder en minder snel thrombine gevormd kan worden (Hemker e.a.1963,1965).

Heparines werken fundamenteel anders, zij veroorzaken een versnelde inactivering van gevormd thrombine. Het duidelijkste bewijs voor de centrale rol van thrombine bij thrombose is wel dat deze twee geheel verschillende geneesmiddelen uiteindelijk hetzelfde effect hebben: Het voorkomen van thrombose wordt ongeveer gehalveerd. Voor de volledigheid noemen we nog aspirine dat een bewezen, bescheiden (- 20%) antithrombotisch effect heeft, waarschijnlijk via zijn werking op de bloedplaatjes.

Omdat thrombine ook een centrale rol speelt bij de bloedstelping is het logisch dat bloedingen de belangrijkste bijwerking van antithrombotische therapie zijn. De hele kunst van medikamenteuse thrombosebehandeling is om binnen het therapeutisch venster te blijven, dat aan de eene kant begrensd wordt door thrombose en aan de andere door bloeding.

De op dit moment beschikbare middelen zijn niet ideaal. Heparine moet drie maal per dag worden geïnjecteerd en leent zich ook verder niet voor langdurige toepassingen. Het geven van orale antistollingsmiddelen vereist gedurige bijstelling van de dosering aan de hand van nauwkeurige laboratoriumcontrole. In Nederland is dat probleemloos mogelijk door een netwerk van uitstekend georganiseerde thrombosediensten. Uit het werk dat Loeliger³ en medewerkers in de jaren 1960 -1985 in Leiden deden blijkt dat onder de nederlandse omstandigheden het voorkomen van recidiefinfarcten door goed orale antistolling kan worden gehalveerd. Dit bewijst dat antistollingstherapie helpt. Het feit dat het in de V.S. en in Duitsland niet lukt bewijst dat er veel praktische problemen zijn. Dat komt door de ingewikkelde dosering en controle. Het zoeken is dus naar farmaka die, in standaarddosering, oraal gegeven kunnen worden, volledige thrombose bescherming geven en geen bloeding veroorzaken.

Dit is een nog ver verwijderd ideaal. Over een onderdeel van dit onderzoek, nl. het zoeken naar betere heparines, handelt dit verslag. Voor we ter zake komen is enige achtergrondinformatie noodzakelijk over het biochemisch mechanisme van de bloedstolling.

Het mechanisme van de thrombinevorming

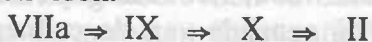
Thrombinevorming is het gevolg van een serie proenzym-enzym omzettingen (1) die plaats vinden aan fosfolipide oppervlakken (2) welke vrijkomen bij beschadiging van weefsels (3) of door activering van bloedplaatjes (4). Het proces wordt gestuurd door een stelsel van positieve (5) en negatieve (6) tegenkoppelingsreacties. Eenmaal gevormd thrombine wordt door antithrombines geïnactiveerd (7). Ieder van deze processen worden nu in het kort beschreven:

1) *Proenzym-enzym cascades.*

De basis van de bloedstolling is activering van een proenzym door een ander enzym, zoals b.v. in de darm trypsine ontstaat uit trypsinogeen door de werking van enterokinase. De inmiddels verouderde cascade theorie (Macfarlane, 1964⁴; Davie & Ratnoff 1964⁵) verklaarde het stollingsproces zelfs alleen via dit principe. Als we met een open pijl een dergelijke activering aangeven (dus: enterokinase \Rightarrow trypsine) dan bestaat de ruggegraat van het stollingsproces uit de activering van prothrombine (factor II) door geactiveerde factor X*, die zelf ontstaat door de werking van geactiveerde factor VII; dus:



Factor VIIa activeert niet alleen factor X maar ook factor IX, die op zijn beurt factor X kan activeren.



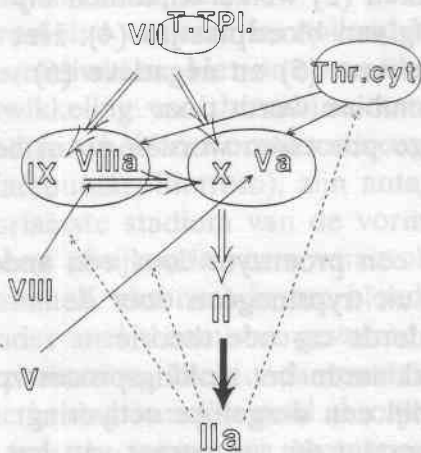
Door dit mechanisme kan een relatief geringe directe factor X activerende activiteit van factor VII versterkt worden. Naar de ontdekker François Jossa⁶ noemen we dit mechanisme de Jossa-lus. Het geheel van de proteolytische proenzym activeringen is aangegeven door de open pijlen in fig.1.

2) *Heterogene biokatalyse; fosfolipiden en de cofactoren*

Het tweede algemene biochemische mechanisme in de bloedstolling is de heterogene biokatalyse, d.w.z. het verschijnsel dat de activeringsreacties zich afspelen aan een grenslaag. De activering van prothrombine door factor Xa is in vrije oplossing mogelijk. Er is echter meer dan 60 maal de plasmaconcentratie (2 μM) prothrombine voor nodig om de reactie op half maximale snelheid te laten verlopen. Die snelheid is dan één pover thrombinemolecuul per 1½ minuut per molecuul factor Xa. De concentratie die zo in plasma bereikt kunnen worden zijn kleiner dan 10 pM. Bij normale thrombinevorming komt er echter 200-400 mM thrombine vrij. Optimale omzetting van factor II door factor Xa is pas mogelijk door een samengesteld enzym dat ontstaat doordat factor Xa en factor Va naast elkaar aan fosfolipiden binden (Papahadjopoulos & Hanahan 1964⁷, Hemker e.a. 1967⁸). De fosfolipiden maken dat het enzym bij fysiologische prothrombineconcentraties voor >98% met zijn substraat verzadigd kan worden: de K_m daalt bv. van 120 μM tot 30 nM (Rosing⁹ 1980⁹). Ook voor factor X activering is een complex enzym nodig (Hemker & Kahn 1967¹⁰). De kinetische effecten zijn vergelijkbaar met die in het

¹* Voetnoot: geactiveerde factoren worden aangegeven met het subscript a. dus geactiveerde factor X = F.Xa.

prothrombinasecomplex (Van Dieyen* 1981¹¹). Factor VIIIa is hier de noodzakelijke cofactor. In fig.1 worden de fosfolipiden weergegeven door ovaal.



Figuur 1

Een reactieschema van de bloedstolling

De open pijlen geven enzymatische activering aan. De positieve tegenkoppelingsreacties van het thrombine zijn weergegeven met stippelijnen. Getrokken pijlen zijn chemische omzettingen. De ovaal staan voor fosfolipideoppervlakken.

T.Tpl. = weefselthromboplastine.

Thr.cyt = bloedplaatje.

3) De trigger: weefselbeschadiging

Celmembranen bestaan uit een dubbellaag van fosfolipiden, Ze zijn asymmetrisch, d.w.z. dat de fosfolipide samenstelling van de buitenlaag anders is dan die van de binnenlaag (Zwaal* e.a. 1975¹²). Wil een fosfolipide kunnen werken in de stollingsreacties dan moet het fosfatidylserine bevatten. Dit komt echter praktisch alleen aan de binnenzijde van de celmembraan voor. Daarom worden intacte cellen niet stollingsbevorderend. Zodra een cel beschadigd wordt vormt de blootkomende binnenzijde een bron van stollingsbevorderend fosfolipide. Dit, samen met het feit, dat uit een cel ook thromboplastine vrijkomt maakt dat contact van plasma met beschadigde cellen altijd de kiem van bloedstolling in zich bergt.

Thromboplastine is een lipoproteïne. Het eiwitdeel ervan speelt voor factor VII eenzelfde rol als factor Va voor factor Xa of factor VIIIa voor factor IXa. Het bijzondere van factor VII is dat hij niet beslist proteolytisch geactiveerd hoeft te worden om factor X te kunnen omzetten. Het complex van factor VII met thromboplastine heeft een activiteit van 1-4% van dat van hetzelfde complex met factor VIIa. Daardoor is het mogelijk dat er, zodra er thromboplastine beschikbaar komt, enig factor Xa en factor IXa ontstaat. Deze factoren activeren dan factor VII in een kleine positieve tegenkoppelingsslus. Factor Xa en factor IXa verbinden zich echter ook met de extrinsic pathway inhibitor (E.P.I.). Factor Xa - EPI is een krachtige remmer van het factor VIIa-thromboplastine complex. Het gevolg is een snel toenemende maar ook in de tijd beperkte golf van factor X en factor IX activering. Als het thromboplastine effect door EPI-Xa is geremd dan blijft altijd factor IXa voor de factor X activering beschikbaar. Dit verklaart misschien het nut van de Jossen-lus.

4) De rol van de bloedplaatjes

Bloedplaatjes kunnen in intacte staat stollingsbevorderend werken. Zodra die gedurende een zekere tijd in contact komen met een geringe hoeveelheid thrombine, vooral als ze tegelijkertijd geactiveerd worden door collageen, vertonen zij de translocase-reactie of flip-flop (Bever* e.a. 1982¹³). Het

fosfatidylserine verdeelt zich gelijkelijk over beide zijden van de celmembraan zonder dat de cel stuk gaat. Behalve de flip-flop reactie veroorzaakt thrombine bij bloedplaatjes "release". D.w.z. dat er door het bloedplaatje een groot aantal stoffen, waaronder factor V worden uitgestoten.

5) *Positieve tegenkoppeling*

Als door weefselbeschadiging de bloedstolling op gang komt kan dat niet zijn via het volledige mechanisme. De versnellende factoren Va en VIIa kunnen immers nog niet zijn gevormd bij afwezigheid van thrombine. Het weinige thrombine dat in het begin van het stollingsproces toch ontstaat dient in de eerste plaats juist voor het activeren van de factor V en VIII en van bloedplaatjes (Lindhout* 1989¹⁴, Béguin* 1989¹⁵).

Thrombinevorming leidt ook tot plaatjesaggregatie en tot de releasereactie van plaatjes. Aggregatie, het aaneenkleven van bloedplaatjes, maakt ongestoorde thrombinevorming binnen het aggregaat mogelijk. Daar buiten treedt zolang er stroming is, uitwassing en verdunning van thrombine op zodat, buiten een bepaalde kritische afstand, de remmende processen het winnen van de stollingsbevorderende processen. Bij de releasereactie komen uit de bloedplaatjes een grote verscheidenheid van verschillende stoffen vrij, waarvan sommigen verdere aggregatie bevorderen (ADP), anderen de stolling bevorderen (factor V) en weer anderen antistollende factoren tegenwerken (bv. plaatjesfactor 4 dat heparine remt). Zowel hier als bij het chemische proces van thrombinevorming heeft men te doen met sterk niet-lineaire verschijnselen. Een van de gevolgen daarvan is het drempelfenomeen. Zodra een prikkel een bepaalde drempel overschrijdt, wordt het fenomeen versterkt, anders wordt het uitgedoofd.

6) *Negatieve tegenkoppeling*

Op intact endotheel komt het eiwit thrombomoduline voor. Als thrombine hieraan bindt, krijgt het sterk veranderde eigenschappen. Het is dan niet meer in staat fibrinogeen om te zetten of de factoren V en VIII of bloedplaatjes te activeren. In plaats daarvan activeert het nu proteïne C. Geactiveerd proteïne C (PCa) breekt factor Va en VIIa af; hierbij werkt het samen met het verwante proteïne S. Op deze wijze werkt thrombine zijn eigen vorming tegen als er intact endotheel in de buurt is en blijft de procoagulante werking beperkt tot het beschadigde vaatgedeelte.

7) *Inactivering van thrombine*

In plasma komen een groot aantal eiwitten voor die circulerende eiwitplitsende enzymen remmen. Het antithrombine III (AT III) is voor de bloedstolling het belangrijkste. Het kan alle vrije (d.w.z. niet fosfolipide gebonden) serineproteaseremmers inactiveren maar zijn affiniteit voor thrombine is het hoogste. Deze remmer is vooral belangrijk omdat heparines zijn werking honderden malen versterken (zie later).

Een andere remmer is heparine cofactor II (HC II). Deze is in plasma normaliter niet actief. Heparine in hoge concentratie, maar ook allerlei andere negatieve polyelectrolyten (zoals dermatan sulfaat en lactobionzuur) induceren een remmende activiteit die, in dit geval, uitsluitend tegen thrombine gericht is.

α_2 Macroglobuline tenslotte is een merkwaardige remmer omdat hij alle proteasen remt zonder aanzien des persoons, maar op een fundamenteel

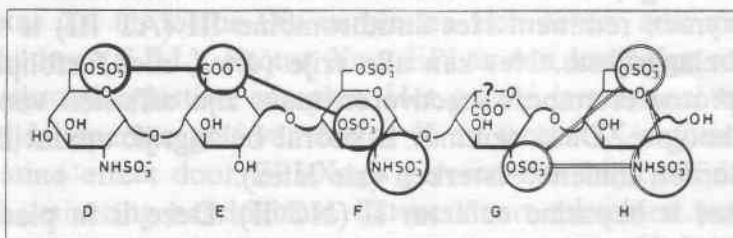
andere wijze als alle andere remmers. Niet nl. door zich te verbinden met het actieve centrum maar door het enzym "op te slokken" in zijn eigen structuur. Het enzym-remmer complex dat zo ontstaat bezit nog steeds het actieve centrum van het oorspronkelijke enzym, maar door sterische hindering is dat niet langer actief tegen zijn fysiologische, grootmoleculaire substraten. Wel echter tegen de kleine substraten die wij als signaalmoleculen voor de enzymactiviteit gebruiken. Dit geeft aanleiding tot interessante, maar beheersbare problemen in de eigenlijke proeven.

Enzymologie en moleculaire fysiologie

Veel van het bovengeschetste reactieschema kennen we door bestudering van de interactie tussen gezuiverde componenten van het systeem. Naast deze enzymologische studies is het ook nodig om de "moleculaire fysiologie" van de bloedstolling te bestuderen, d.w.z. het mechanisme in ongefractioneerd plasma of bloed "als geïsoleerd orgaan". Dit leidt soms tot verrassende verschillen met wat men op grond van de enzymologie verwachtte. Veel van de resultaten die wij verkregen op het gebied van heparines komen voort uit deze benadering.

Heparines en de factor Xa hypothese

Heparine wordt gewonnen uit het darmslijmvlies van varkens of uit runderlong. Het is een lineair polysaccharide bestaande uit afwisselend hexuronzuur (L-iduronzuur of D-glucuronzuur) en D-glucosamide die beide op verschillende plaatsen geacetyleerd of gesulfateerd kunnen zijn. Het moleculairgewicht varieert van 5000 tot 30000, hetgeen overeenkomt met ketenlengtes van 15 tot 90 suikereenheden. Het gemiddelde ligt bij 12000 en 15000 (35-45 suikerresten). Ongeveer een derde van de heparinemoleculen kan aan AT III binden. Deze moleculen versterken dan de werking van het AT III enorm. Thrombine en andere stollingsfactoren worden veel sneller dan normaal geïnactiveerd. De concentraties thrombine in stollend bloed worden daardoor veel lager. Het is gebleken dat voor de binding van heparine aan AT III een bepaalde pentasaccharidesequentie nodig is, dat zijn werking ontleent aan een specifiek distributiepatroon van sulfaatgroepen en acetylgroepen (Fig.2).



Figuur 2 Het AT III bindende pentasaccharide uit heparine

De omcirkelde groepen in D,E en F binden eerst zwak aan AT III, waarna de binding versterkt wordt door interactie met de omcirkelde groepen in G en H. (naar Petitou¹⁶ 1989)

Heparine is een efficient antithromboticum, maar het moet drie maal per dag worden ingespoten. Bovendien vertoont het bijwerkingen zoals bloedingen en thrombopenie en is het niet geschikt voor langdurige toediening. Ongeveer 10 jaar geleden begon men de studie van hydrolyseproducten van natuurlijk heparine, de z.g. laagmoleculairgewichtheparines (LMWH) met moleculargewichten van 2000 - 7000. Zij bleken therapeutisch minstens even werkzaam als natuurlijk heparine en veroorzaakten minder bloedingen en andere bijwerkingen. Bovendien hoefden zij maar één maal per dag te worden ingespoten.

Men meende te kunnen vaststellen dat de LMWH preparaten met dalend gemiddeld molgewicht gelijkelijk de mogelijkheid verliezen om thrombine te inactiveren maar nog wel de inactivering van factor Xa katalyseren. Dit leidde tot de volgende hypothese:

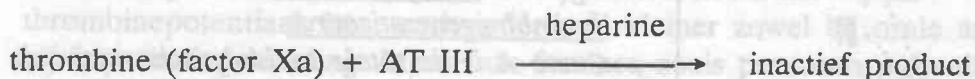
De anti-factor Xa activiteit van een heparine bepaalt zijn antithrombotische werking terwijl bloedingen worden veroorzaakt door de antithrombine werking.

Omdat het primaire doel is om farmaca te vinden die antithrombotisch werken zonder bloedingen te veroorzaken is een dergelijke hypothese, zeker als hij juist is, goud waard. Hij geeft immers een richtlijn die het mogelijk maakt nieuwe preparaten te zoeken zonder direct vivo onderzoek bij proefdieren en klinisch onderzoek bij mensen.

De franse farmacoloog Jean Choay (1983¹⁷) trok de logische consequentie en synthetiseerde met zijn groep in een 74 staps synthese het kleinste saccharide dat aan AT III kan binden. Dit pentasaccharide stimuleerde de remming van thrombine helemaal niet meer maar die van factor Xa nog steeds. De vraag was nu of dit een goed antithromboticum zou zijn. Voordat dat bekend werd mochten wij roet in het eten strooien door de basis te ontnemen aan de werkhypothese die aan de ontwikkeling ten grondslag had gelegen.

Antithrombine- en anti-factor Xa activiteit

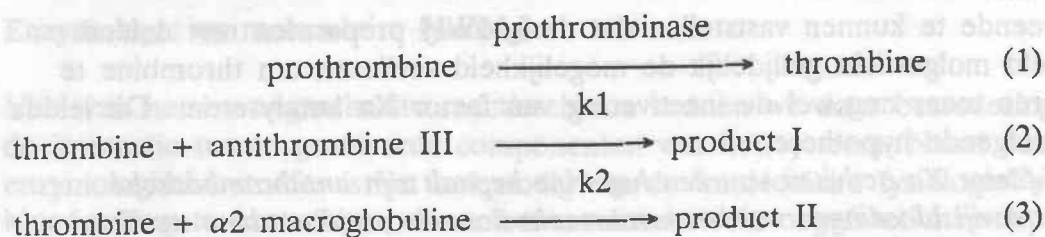
Om de anti-thrombine activiteit van een heparine te bepalen voegt men thrombine aan een plasmamonster toe en meet hoe snel de activiteit afneemt. Voor de anti-factor Xa activiteit doet men hetzelfde met toegevoegd factor Xa. Over het algemeen zal men bovine stollingsfactoren gebruiken omdat de menselijke eiwitten moeilijk te verkrijgen zijn, en werken zonder Ca^{++} ionen toe te voegen omdat anders de stolling, en dus de activering van endogeen thrombine en factor Xa in het mengsel op gang komt. Dit kon men veilig doen omdat, naar men dacht de biochemische reactie altijd dezelfde is, nl



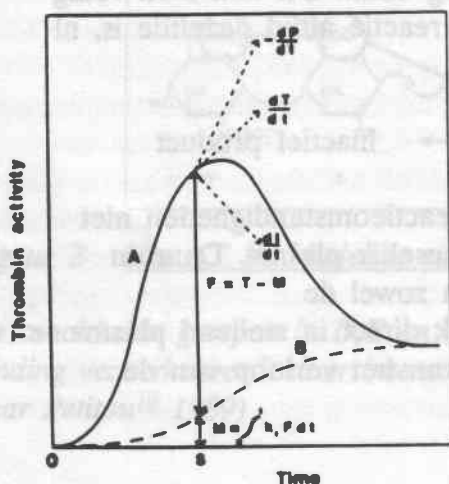
Wij wantrouwden deze benadering omdat de reactieomstandigheden niet onbelangrijk verschilden van die in stollend menselijk plasma. Daarom ontwikkelden een methode om de snelheid van zowel de prothrombineomzetting als de thrombineafbraak direct in stollend plasma te bepalen. Deze methode berust op de analyse van het verloop van de

thrombineconcentratie in stollend plasma (Hemker,¹⁸ 1987).

Het meten van het ontstaan en verdwijnen van thrombine in plasma is een stokoude techniek. Wij moesten haar echter orden van grootte nauwkeuriger maken om er zinvol mee te kunnen rekenen. Hiertoe ontwikkelden we een twee-golflengten fotometer van grote precisie en een systeem om de tijd waarop monsters worden getrokken en reactie beëindigd direct te registreren. De thrombineconcentratie is de resultante van de volgende simultaan verlopende reacties:



Reacties 2 en 3 zijn pseudo-eerste orde: Omdat de remmers in overmaat aanwezig zijn is de reactiesnelheid in goede benadering evenredig met de thrombineconcentratie. Het vormen van thrombine in plasma is daarom als het volgieten van een badkuip zonder stop. Hoe meer er in zit hoe harder het wegloopt. Het thrombinegehalte is analoog aan het waterniveau in de badkuip, hoe hoger het is hoe harder het verdwijnt. Heparine vergroot de reactieconstante van reactie 2, verwijdt als het ware de afvoeropening. De factor Xa hypothese over de heparinewerking betekent eigenlijk dat heparine niet alleen de afvoer verwijdt maar ook de instroomsnelheid beïnvloedt. Om deze hypothese te toetsen berekende wij de snelheid van prothrombineomzetting. De experimenteel waargenomen snelheid van verandering van de thrombineconcentratie (v_{exp}) is de som van aanmaaksnelheid ($-dP/dt$, P =prothrombineconcentratie) en afbraaksnelheid (v_{dec}). De afbraaksnelheid kunnen we berekenen als we de thrombineconcentratie en de reactieconstanten ($k_{dec} = k_1 + k_2$) van de inactiveringsreactie kennen ($v_{dec} = k_{dec} \cdot T$, T =thrombineconcentratie). De afbraakconsanten kunnen we uit een onafhankelijke proef verkrijgen door het verdwijnen van thrombine te meten als wij de prothrombineomzetting door een kunstgreep stilleggen. Daarna kunnen we dus de aanmaaksnelheid van het thrombine (= prothrombineomzettingssnelheid) uitrekenen ($-dP/dt = v_{exp} + k_{dec} \cdot T$).



Figuur 3 Analyse van de thrombinegeneratiecurve

Curve A is de totale amidolytische activiteit (T) die wordt gemeten; B is de bijdrage daaraan van het $\alpha 2$ M-thrombinecomplex (M). De afbraaksnelheid van thrombine (dI/dt) plus de experimenteel gevonden snelheid (dT/dt) geeft de prothrombine omzettingssnelheid ($-dP/dt$)

In de praktijk wordt deze som gecompliceerd doordat een gedeelte van de thrombine gevangen wordt door $\alpha 2$ -macroglobuline en een product vormt dat we wel meten in onze proef maar dat geen biologische activiteit heeft. Factor Xa is het enzym dat prothrombine omzet. Als laagmoleculairgewicht heparines werken doordat zij vooral factor Xa remmen dan moet dat in dit soort proeven blijken doordat de omzettingssnelheid van prothrombine in aanwezigheid van LMWH vermindert. Dit bleek echter niet het geval. Gewoon heparine zowel als LMWH beïnvloeden praktisch alleen de afbraaksnelheid van thrombine en niet zijn vormingssnelheid. Hiermee was de factor Xa hypothese dus van de baan (Béguin^{*19},1988).

Een alternatieve hypothese

Zoals gezegd is het voor het ontwikkelen van goede antithrombotica zeer nuttig om over een in vitro model te beschikken dat de werkzaamheid van een potentieel antithromboticum voorspelt. Het thromboseonderzoek is tot nu toe niet erg gelukkig geweest met zijn modellen. Vanaf 1964 zoekt men op basis van de plaatjesaggregatie naar remmers van bloedplaatjes, zonder tot nu toe iets gevonden te hebben dat wezenlijk beter is dan aspirine. Zoals we zagen moet ook de factor Xa hypothese moest worden bijgezet. Er is dus ruimte voor een nieuwe hypothese.

Waaraan moet een in vitro procedure voldoen om een goed model voor antithrombotische werking te zijn? In de eerste plaats moet de proef beïnvloed worden door alle stoffen waarvan een antithrombotische werking is aangetoond. In de tweede plaats moet het in het bloed van patienten onder antithrombotische behandeling dezelfde veranderingen te zien geven als na toevoeging van antithrombotica. Liefst zelfs zo dat geheel verschillende vormen van behandeling, zoals orale antistolling en heparine, ook quantitatief dezelfde veranderingen veroorzaken. In de derde plaats moeten patienten met een verhoogd thromboserisico een tegengestelde verandering van de proef laten zien. Ten laatste is er de praktische eis dat de proef makkelijk uitvoerbaar moet zijn in het klinische en farmacologische laboratorium.

Zoals boven uitgebreid betoogd, menen wij dat thrombine iets te maken heeft met thrombose. Thrombine is een enzym, 1 nM thrombine gedurende 10 min. zal ongeveer dezelfde werking zal hebben als 10 nM gedurende 1 min. Dit bracht ons op de gedachte dat de concentratie-tijd integraal van thrombine in stollend plasma misschien een nuttige maat was van de antithrombotische werking. Deze integraal kan men meten als het oppervlak onder de thrombinegeneratiecurve (fig.3). Dit oppervlak noemden wij de thrombinepotentiaal, het wordt inderdaad kleiner zowel bij orale antistolling als bij heparinebehandeling. Maar ook farmaca zoals pentosan polysulfaat en dermatan sulfaat, die bij proefdieren een duidelijk antithrombotisch effect vertonen, zonder dat zij een van de bestaande bloedstollingstests beïnvloeden, hebben een duidelijke invloed op de thrombinepotentiaal. Hetzelfde geldt voor hirudine, lactobionzuur en andere experimentele antithrombotica. Patienten onder orale antistollingsbehandeling zowel als patienten die heparine of LMWH krijgen vertonen een daling van hun thrombinepotentiaal. Nog

tekenender is het dat patienten met een aangeboren tekort aan AT III, die een duidelijke thromboseneiging vertonen, ook een verhoogde thrombinepotentiaal laten zien.

Het meten van de thrombinepotentiaal als het oppervlak onder de thrombinegeneratiecurve is een moeilijke, langdurige en kostbare zaak. Daarom hebben wij een methode gezocht die hetzelfde meet in een veel eenvoudiger proef. Het essentieel van deze methode is dat men een slecht substraat van thrombine aan het stollende plasma toevoegt. Het thrombine kan dan gedurende zijn verblijf in het plasma niet alle substraat omzetten omdat het geïnactiveerd is voordat het substraat op is. De hoeveelheid substraat die is omgezet is een maat voor de concentratie-tijdsintegraal van het thrombine.

Met deze proef blijkt dat werkzame doses van heparine en LMWH dezelfde invloed hebben op de thrombinevorming in plasma. De betere werking van LMWH is waarschijnlijk vooral een gevolg van zijn gunstiger farmakokinetische eigenschappen: het verdwijnt minder snel uit de circulatie dan gewoon heparine en na subcutane injectie komt het in de loop van ongeveer twee uur geheel in de bloedbaan terecht terwijl van gewoon heparine slechts ongeveer eenderde deel beschikbaar komt.

Wij hopen met deze thrombinepotentiaal een bepaling in handen te hebben die a) gebruikt kan worden voor het opsporen van nieuwe antithrombotica en b) in de kliniek gebruikt kan worden als een universele test voor het meten van het effect van antithrombotische farmaca.

Het heparine van de toekomst ?

Verdere onderzoeken met fracties van verschillende soorten heparines toonden aan dat de effectiviteit van een heparine een resultante is van twee in tegengestelde richting werkende tendensen. Beneden een grens van 5400 MW (18 suikereenheden) verliezen heparines hun antithrombine- en daarmee hun belangrijkste antithrombotische activiteit. Bij lager het moleculairgewicht echter, wordt de halfwaardetijd langer en komt het materiaal na een subcutane injectie vollediger in de bloedbaan beschikbaar. Tot aan een moleculairgewicht van ongeveer 7200 blijft de farmacokinetiek van heparines vrij gunstig: een keer inspuiten per dag volstaat en praktisch alle materiaal dat subcutaan wordt ingespoten komt ook in het plasma terecht. De beste heparines lijken dus die met een moleculairgewicht van tussen de 5400 en 7200.

Het is mogelijk laagmoleculairgewicht heparines anders dan per injectie toe te dienen. Van oraal of via inhalatie toegediend materiaal komt een zekere hoeveelheid in de bloedbaan terecht. Het probleem is echter dat de opname wisselt zodat een preciese dosering moeilijk is, wat weer de mogelijkheid van bloedingen oproept.

In dit verband is het interessant om te denken aan heparineachtige stoffen (dermatan sulfaat, lactobionzuur) die werken via heparin cofactor II. Dit plasmaeiwit circuleert in het plasma in een concentratie van $1 \mu\text{M}$. Dit is weinig vergeleken met AT III ($3 \mu\text{M}$) en met name minder dan prothrombine ($2 \mu\text{M}$) en dus minder dan de potentiële hoeveelheid thrombine. Dit maakt dat er een natuurlijke bovengrens is gesteld aan de activiteit van dermatan

sulfaat, wat weer speelruimte laat aan toedieningsvormen die geen nauwkeurige controle van de plasmaconcentratie toelaten.

Nawoord

Dit onderzoek werd grotendeels uitgevoerd in het Instituut voor Hart-en Vaatziekten en de Vakgroep Biochemie van de Rijksuniversiteit Limburg, samen met de medewerkers die in de tekst met * zijn aangeduid. De literatuurlijst die bij deze voordracht hoort is bij de auteur verkrijgbaar.